

## Ag(I)、Au(III)、Pt(IV)离子与 DNA 相互作用的光谱研究

王树玲 于俊生\* 邹燕辉  
(南京大学化学系, 南京 210093)

本文用中药小檗碱作为探针分子, 在  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸-醋酸钠缓冲体系中, 用荧光和紫外-可见吸收光谱研究了贵金属离子 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV) 与 DNA 的相互作用。在三种贵金属离子中, Au(III)、Pt(IV) 离子对小檗碱-DNA 体系均具有明显的荧光猝灭作用, 而 Ag(I) 离子对该体系有强烈的荧光敏化作用。分别求出了三种贵金属离子与 DNA 的结合常数。三种贵金属离子与 DNA 结合能力的强弱顺序依次为: Au(III) > Ag(I) > Pt(IV)。探讨了三种贵金属离子与 DNA 的作用机理及导致结合力不同的原因。

关键词: Ag(I) Au(III) Pt(IV) DNA  
分类号: O657.3

癌症严重威胁着人类的健康。因此, 抗癌药物及其机理的研究已成为重要的课题之一。自 Rosenberg<sup>[1]</sup> 报道顺铂具有抗癌活性以来, 贵金属离子与 DNA 相互作用的研究已引起了人们的普遍关注。一些贵金属制成的抗癌药物, 如金属配合物, 象顺铂、卡铂以及正在开发的钷配合物等已有报道<sup>[2-8]</sup>。但这些研究工作主要是集中在贵金属配合物与 DNA 相互作用的研究方面, 直接研究贵金属离子与 DNA 相互作用的工作少见报道。然而, 贵金属离子与 DNA 的键合相互作用对理解和阐明贵金属药物与 DNA 的作用机理具有重要意义。鉴于贵金属离子与 DNA 键合作用的复杂性, 直接用紫外吸收光谱研究存在一定的难度。而一般贵金属离子, 如 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV) 自身都不能发射荧光, 因此直接用荧光方法研究 DNA 与它们的相互作用也比较困难。研究发现<sup>[9]</sup> 中药小檗碱(BER)与 DNA 的相互作用能使小檗碱在 526nm 处的荧光显著增强。而在同样条件下, 贵金属离子对小檗碱的荧光无明显影响。因此, 本文以小檗碱作为探针分子, 在弱酸性条件下, 用荧光光谱和吸收光谱研究了 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV) 三种贵金属离子与 DNA 的相互作用, 并求出了这些贵金属离子与 DNA 的结合常数。分析了三种贵金属离子与 DNA 结合能力的强弱顺序, 初步探讨了

三种贵金属离子与 DNA 结合作用的机理。

## 1 实验部分

## 1.1 试剂与仪器

LS-50B 型荧光/发光光谱仪 (Perkin-Elmer 公司), 联有 Pentium 586 计算机及专用数据管理支持软件, 1cm 方形石英荧光池, 该仪器的激发光谱具有自动校正功能; UV-3100 型紫外-可见吸收光谱仪 (Shimadzu 公司); PHS-2C 型数字式酸度计 (上海大中分析仪器厂)。

盐酸小檗碱购自 Acros 生物化学公司 (纯度为 97%), 用二次去离子蒸馏水准确配制成  $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  储备液; 小牛胸腺 DNA 购自华美生物公司。准确称取一定量的小牛胸腺 DNA, 用二次蒸馏水溶解后转移至透析袋中透析 48h。储备液的纯度用紫外吸收光谱法确定, 测得  $A_{260}/A_{280} > 1.80$ ; 浓度由 260nm 处的吸光度确定, 该波长处的摩尔吸光系数采用  $6600 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ <sup>[10]</sup>。盐酸小檗碱和 DNA 的储备液均置于冰箱中保存。Ag(I) 离子储备液是用硝酸银固体 (分析纯) 按标准方法配制, 储备液的 pH 值为 6.22; Au(III) 和 Pt(IV) 离子的储备液: 分别将 Au 丝 (纯度 99.9%) 和 Pt 丝 (纯度 99.9%) 溶于王水并配成浓度为  $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液。用

收稿日期: 2002-03-15。收修改稿日期: 2002-04-26。

南京大学 985 学科发展项目资助 (No. 2000)。

\* 通讯联系人。E-mail: ndchemyu@public1.ptt.js.cn

第一作者: 王树玲, 女, 26 岁, 硕士生; 研究方向: 分子光谱及分析。

时将储备液在水浴上蒸至近干使溶液脱酸, 并保持溶液 pH 值在 4.00~4.50 之间。所用的缓冲体系为  $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸 - 醋酸钠溶液 (pH = 4.73)。其它试剂均为分析纯, 所有溶液均用二次去离子蒸馏水准确配制。

## 1.2 实验方法

取 10 只 10mL 容量瓶, 先分别加入 1.50mL 小檗碱储备液、1.50mL DNA 储备液以及 1.00mL 醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液, 然后再依次加入不同量的贵金属离子, 用二次水稀释至刻度。室温条件下, 用 1cm 石英池在荧光光谱仪上测试各溶液的荧光强度。测量时选择的激发波长和发射波长分别为 365nm 和 526nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5nm, 扫描速度为  $500\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在 UV-3100 型紫外 - 可见吸收光谱仪上进行紫外 - 可见吸收光谱测定, 用相应的空白溶液作参比。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱

图 1 是在  $0.01\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸 - 醋酸钠缓冲体系中, 在小牛胸腺 DNA 存在下, 分别记录的小檗碱和贵金属离子的荧光光谱。图中也记录了小檗碱单独存在及小檗碱与贵金属离子二者共存时体系的荧光光谱。在图 1 中, 曲线 a 是在  $3.00 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DNA 存在下, 小檗碱的荧光发射光谱; 而曲线 c 是与曲线 a 同样浓度的小檗碱单独存在时的荧光发射光谱。曲线 b 是在与曲线 c 同样浓度的小檗碱存在下, 记录的 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV) 三种贵金属离子的荧光光谱。曲线 d 则是在与曲线 a 同样浓度的 DNA 存在下, 记录的上述三种贵金属离子体系的荧光光谱。由图 1 可以看出, 由于 DNA 的存在, 小檗碱在 526nm 处的荧光发射被大大地敏化了 (曲线 a)。而三种贵金属离子在 DNA 存在时, 几乎观察不到荧光 (曲线 d)。比较曲线 b 和 c, 同样可以看出贵金属离子的存在对小檗碱的荧光发射基本没有影响, 这表明二者之间没有明显的键合作用。

图 2 是将相同浓度的 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV) 三种贵金属离子分别加入到小檗碱 - DNA 二元体系所记录的荧光光谱。图 2 中曲线 b (虚线) 是未加入贵金属离子前小檗碱 - DNA 二元体系的荧光光谱, 曲线 a、c、d 是分别加入 Ag(I)、Pt(IV)、Au(III) 离子后小檗碱 - DNA 二元体系的荧光光谱。从图中可以看出, 向小

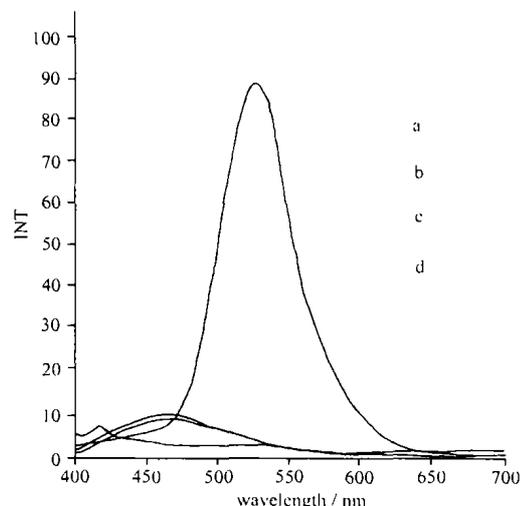


图 1 pH = 4.73 时, 小檗碱在不同体系中的荧光光谱  
Fig. 1 Fluorescence spectra of the berberine in various systems at pH 4.73

a. BER + DNA; b. BER + Metal ion;  
c. BER; d. DNA + Metal ion

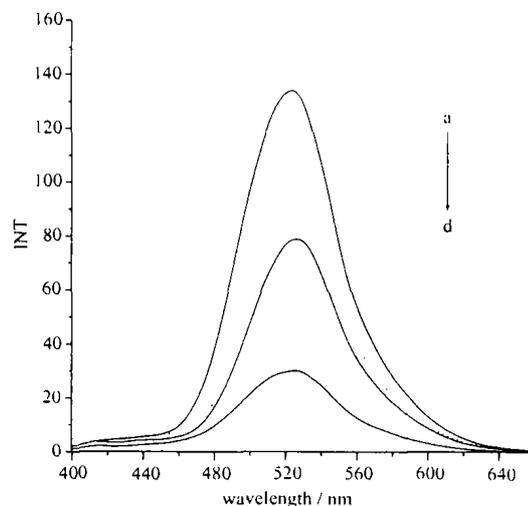


图 2 小檗碱 - DNA 二元体系的荧光光谱随不同贵金属离子的变化

Fig. 2 Fluorescence spectra of the BER-DNA system with various noble metal ions

$C_{\text{BER}} = 3.00 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $C_{\text{DNA}} = 3.00 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $C_{\text{M}} = 1.00 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

a. BER + DNA + Ag(I); b. BER + DNA;  
c. BER + DNA + Pt(IV); d. BER + DNA + Au(III)

檗碱和 DNA 组成的二元体系中分别加入贵金属 Au(III)、Pt(IV) 离子后, 体系的荧光强度被不同程度的猝灭。有趣的是, 在同样的条件下, 当 Ag(I) 离子加入到该二元体系中后, 体系的荧光强度却明显地增强

了。继续增大贵金属离子的加入量,则小檗碱-DNA 体系的荧光强度变化更加明显。图 3 是将不同量的铂离子加入到小檗碱-DNA 二元体系中后记录的荧光发射光谱。图中虚线(曲线 a)为小檗碱-DNA 二元体系的荧光光谱,实线(曲线 b → i)则为向该体系中逐渐加入不同量的铂离子后体系荧光光谱的变化情况。从图 3 中可以看出,随着铂离子加入量的增加,小檗碱-DNA 体系的荧光强度逐渐下降。加入贵金属离子后,小檗碱-DNA 二元体系荧光强度的变化表明,贵金属离子与 DNA 发生了较强的键合相互作用。

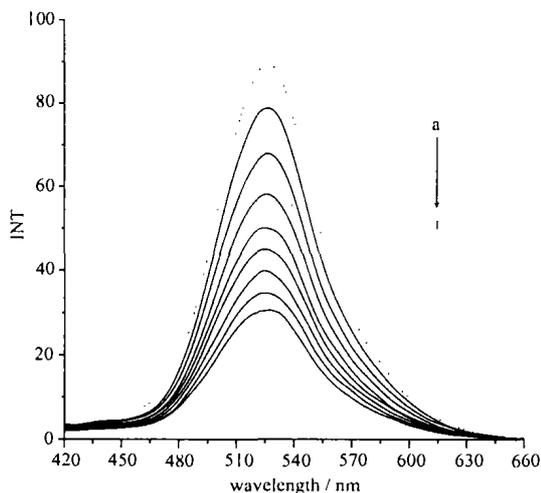


图 3 小檗碱-DNA 体系的荧光光谱随 Pt(IV)离子浓度的增大而变化

Fig. 3 Fluorescence spectra of the BER-DNA system in the absence(---) and presence(—) of Pt(IV) ion  
 $C_{BER} = 3.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $C_{DNA} = 3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 The concentrations of Pt(IV) ion were as follows (M):  
 a. 0; b.  $1.00 \times 10^{-4}$ ; c.  $2.00 \times 10^{-4}$ ;  
 d.  $3.00 \times 10^{-4}$ ; e.  $4.00 \times 10^{-4}$ ; f.  $5.00 \times 10^{-4}$ ;  
 g.  $6.00 \times 10^{-4}$ ; h.  $7.00 \times 10^{-4}$ ; i.  $8.00 \times 10^{-4}$

### 2.2 贵金属离子与小檗碱-DNA 二元体系结合常数的推导

由于贵金属离子与 DNA 的结合作用使得小檗碱-DNA 二元体系的荧光猝灭(铂、金离子)或增强(银离子)。为了定量比较不同贵金属离子与 DNA 结合的能力强弱,我们按以下步骤推导出一种适用于求贵金属离子与 DNA 作用的结合常数的公式。由于贵金属离子仅与小檗碱-DNA 二元体系中的 DNA 发生相互作用,故我们将反应历程简化为贵金属离子与 DNA 间的结合。将结合小檗碱的 DNA 用

DNA\*表示,加入贵金属离子 M 后,把 DNA\*与贵金属离子的生成物视为 M-DNA\*。所以可以把此结合过程简单表示如下:



则结合物 M-DNA\*的形成常数可用下式求得:

$$K = [\text{M-DNA}^*] / [\text{DNA}^*][M] \quad (2)$$

假定体系的荧光强度与发荧光物质的浓度存在线性关系,则得出以下关系:

$$F_0 \propto [\text{DNA}^*]_0, F \propto [\text{DNA}^*]$$

$$\text{并且 } [\text{DNA}^*]_0 = [\text{DNA}^*] + [\text{M-DNA}^*] \quad (3)$$

$$\text{则: } (F_0 - F) / F = ([\text{DNA}^*]_0 - [\text{DNA}^*]) / [\text{DNA}^*] \\ = [\text{M-DNA}^*] / [\text{DNA}^*] = K[M] \quad (4)$$

$$\text{将式(4)整理后得: } F_0 / F = 1 + K[M] \quad (5)$$

将式(5)与荧光猝灭的 Stern-Volmer 方程比较,可以发现二者的形式一致。式(5)中  $F_0$ 、 $F$  分别代表加入贵金属离子前后体系的荧光强度,  $[M]$  为加入贵金属离子的浓度,  $K$  为贵金属离子与 DNA 的表观结合常数,类似于 Stern-Volmer 方程中的猝灭常数  $K_{sv}$ 。由方程(5),以  $F_0 / F$  对加入的贵金属离子浓度  $[M]$  作图,可得一直线。该直线的斜率即为贵金属离子与小檗碱-DNA 二元体系中 DNA 作用的表观结合常数。将实验记录的三种贵金属离子加入前后小檗碱-DNA 二元体系在 526nm 处的荧光强度数值按方程(5)处理后作图并进行拟合,求得三种贵金属 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV)离子与小檗碱-DNA 二元体系中的 DNA 作用的表观结合常数,如表 1 所示。贵金属离子与 DNA 间的结合常数越大,说明两者间的结合力越强。因此,由表 1 中数据可以看出三种贵金属离子与 DNA 结合能力的强弱次序为: Au(III) > Ag(I) > Pt(IV)。

表 1 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV)离子与 DNA 间的表观结合常数  
 Table 1 Apparent Binding Constants of Ag(I)、Au(III)、Pt(IV) with DNA

metal ions	correlation coefficient	apparent binding constants / ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ )
Ag(I)	0.9980	4662
Au(III)	0.9968	16448
Pt(IV)	0.9947	2116

### 2.3 紫外-可见吸收光谱

一般而言,化合物与 DNA 相互作用必然会在电子吸收光谱上有所表现。实验中选择了与 DNA 结合能力较强的 Au(III)和 Ag(I)两种贵金属离子,进行了紫外-可见吸收光谱研究。图 4 是将 Au(III)离子加入

到小檗碱-DNA 二元体系前后所记录的吸收光谱。在图 4 中, 曲线 a(虚线) 是未加入 Au(III) 离子前小檗碱-DNA 二元体系的吸收光谱, 该吸收曲线是在 DNA 存在下, 小檗碱的吸收光谱。图 4 中实线 b、c、d、e 则是向该体系中逐渐增大 Au(III) 离子的加入量所得到的吸收光谱。从图中可以看出, 加入 Au(III) 离子后, 体系的最大吸收峰明显产生增色作用, 并伴随轻微的光谱红移(4nm)。同时观测到两个等吸收点, 分别出现在吸收曲线的 251nm 和 307nm 处。这些结果表明, 小檗碱-DNA 二元体系中的部分 DNA 与 Au(III) 离子发生了强烈的相互作用, 使部分小檗碱分子从小檗碱-DNA 二元体系中释放出来, 从而使体系的吸光度有所改变。

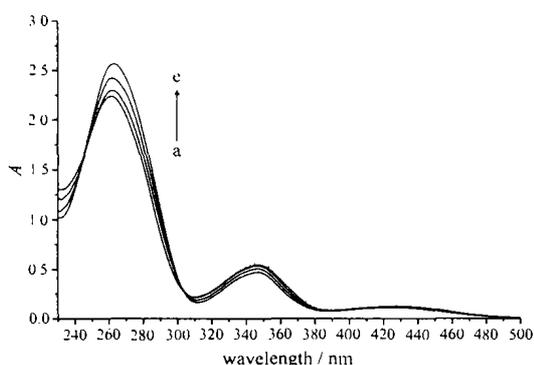


图 4 小檗碱-DNA 体系的吸收光谱随 Au(III) 离子浓度的增大而变化

Fig. 4 Absorption spectra of the BER-DNA system in the absence(---) and presence(—) of Au(III) ion  
 $C_{\text{BER}} = 3.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $C_{\text{DNA}} = 3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 The concentrations of Au(III) ion were as follows(  $M$  ):  
 a. 0; b.  $5.66 \times 10^{-5}$ ; c.  $9.09 \times 10^{-5}$ ;  
 d.  $1.07 \times 10^{-4}$ ; e.  $1.23 \times 10^{-4}$

图 5 是在与图 4 相同的条件下加入 Ag(I) 离子到小檗碱-DNA 体系中所记录的吸收光谱。在图 5 中, 曲线 a(虚线) 是未加入 Ag(I) 离子前小檗碱-DNA 二元体系的吸收光谱, 实线 b → f 为逐渐向该体系中加入 Ag(I) 离子后得到的吸收光谱。从图中可以看出, 加入 Ag(I) 离子后, 小檗碱-DNA 二元体系吸收曲线的最大吸收峰产生减色作用, 吸收曲线的这种变化与加入 Au(III) 离子的情况刚好相反。同时观测到两个等吸收点, 分别出现在吸收曲线的 285nm 和 301nm 处, 并且二元体系的谱峰红移 3nm。

在小檗碱-DNA 二元体系中加入 Au(III)、Ag(I)

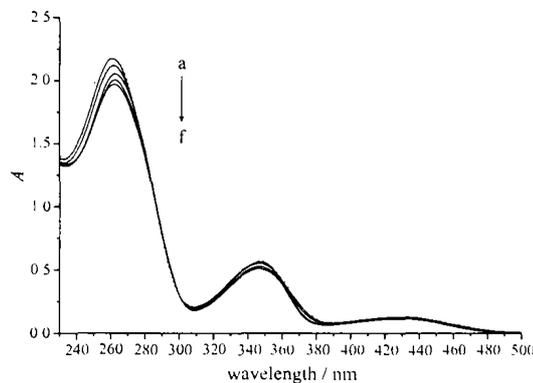


图 5 小檗碱-DNA 体系的吸收光谱随 Ag(I) 离子浓度的增大而变化

Fig. 5 Absorption spectra of the BER-DNA system in the absence(---) and presence(—) of Ag(I) ion  
 $C_{\text{BER}} = 3.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
 $C_{\text{DNA}} = 3.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   
 The concentrations of Ag(I) ion were as follows  
 ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  
 a. 0; b.  $3.85 \times 10^{-5}$ ; c.  $5.66 \times 10^{-5}$ ;  
 d.  $9.09 \times 10^{-5}$ ; e.  $1.38 \times 10^{-4}$ ; f.  $1.67 \times 10^{-4}$

离子后, 最大电子吸收峰出现的增色(Au(III))或减色(Ag(I))作用, 光谱的红移以及等吸收点的出现表明, Au(III)和 Ag(I)离子均与 DNA 发生了强烈的键合相互作用。而两种离子加入后, 在小檗碱-DNA 二元体系的吸收光谱上, 观测到最大吸收峰的不同变化。这表明, 两种离子在与 DNA 的键合模式上可能存在差异。吸收光谱的这种现象刚好与二者在相同体系中的荧光光谱特征相对应。

利用最大吸收峰处的吸光度, 应用摩尔比法, 分别将加入 Au(III)、Ag(I) 离子到小檗碱-DNA 体系前后的相对吸光度对贵金属离子与 DNA 的浓度比作图得到图 6。在图 6 中, 当曲线斜率发生变化时, 两切线的交点处所对应的横坐标数值即相当于贵金属离子与 DNA 间发生作用时的最大结合数。从图 6a 中求出 Au(III) 离子与 DNA 的最大结合数为 0.46; 由图 6b 中求出 Ag(I) 离子与 DNA 间发生相互作用时的最大结合数为 0.43。由此, 可以看出, 尽管 Ag(I) 和 Au(III) 两种离子的价态不同, 并且二者对小檗碱-DNA 体系的荧光及吸收光谱的影响存在明显的差异, 但两种离子与 DNA 的键合比基本一致, 均接近 1:2, 即一个金属离子相当于同时与双螺旋结构的 DNA 分子中的两个碱基或磷酸基键合。

## 2.4 贵金属离子与 DNA 结合的机理探讨

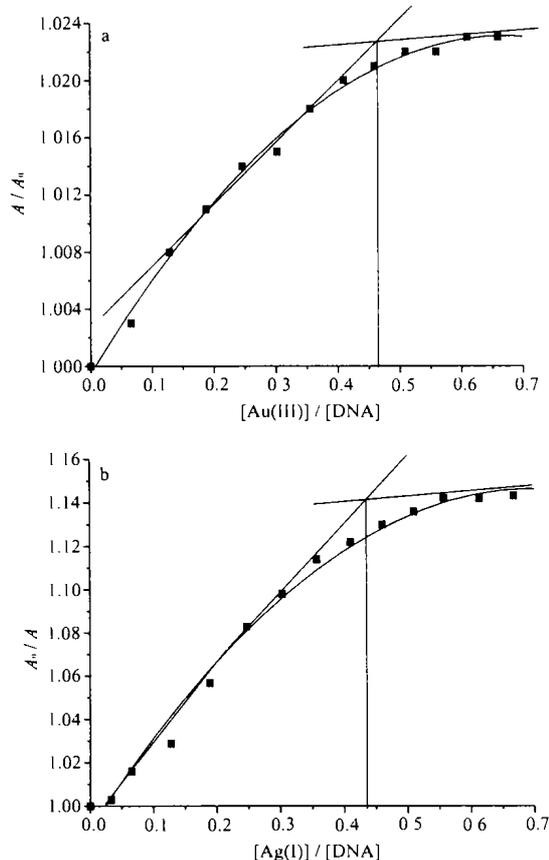


图 6 金属离子与 DNA 结合的摩尔比测定

Fig. 6 Mole ratio determinations of the bindings of the metal ions with DNA

a. Au(III) + DNA; b. Ag(I) + DNA

DNA 双螺旋结构分子中存在由四种碱基构成的疏水性内核和由带负电的磷酸基骨架组成的亲水性外壳。根据 DNA 的结构特点, 四个碱基和磷酸基均为金属离子与 DNA 键合作用的可能位点。在小檗碱-DNA 二元体系中分别加入 Au(III)、Pt(IV)离子时, 该体系的荧光强度显著猝灭以及吸收光谱的明显增色作用表明这两种贵金属离子与该二元体系中的 DNA 发生了较强的相互作用, 可能是由于 Au(III)、Pt(IV)离子与 DNA 的键合作用使小檗碱-DNA 二元体系中的部分小檗碱分子释放出来, 从而导致了该体系荧光光谱和吸收光谱的变化。而 Ag(I)离子的加入使该体系的荧光及吸收光谱变化与前者不同, 可能是由于 Ag(I)离子与 DNA 的作用位点与 Au(III)、Pt(IV)离子与 DNA 的结合方式不同所致, 更深入的机理有待进一步研究。

三种贵金属 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV)离子与 DNA 作

用时具有不同的键合能力, 这与贵金属离子的种类、所带的电荷数、几何构型、在周期表中所处的位置以及配离子的性质及构型均有关系<sup>[11,12]</sup>。银元素在元素周期表中处于第五周期, 而铂、金元素则处于第六周期。所带电荷数的大小依次为 Pt(IV) > Au(III) > Ag(I)。从贵金属所形成的配合物的几何构型来看, 通常情况下 Pt(IV)配合物为八面体构型, Au(III)配合物为平面正方形构型, Ag(I)则易形成直线型配合物。一般而言, 平面正方形结构的配离子易在位阻较小的 Z 轴方向上与配体结合, 所以 Au(III)离子与 DNA 的结合能力要大于 Pt(IV)离子。尽管 Ag(I)离子的配位能力较强, 但其活性要弱于以  $sp^3$  杂化态成键的 Au(III)离子。本文测定的 Ag(I)、Au(III)、Pt(IV)三种贵金属离子与 DNA 间的结合常数大小次序与这些贵金属离子配合物的有关配位理论相符合。

## 参 考 文 献

- [1] Rosenberg B. et al *Nature*, **1969**, **222**, 385.
- [2] Franklin S. J., Treadway C. R., Barton J. K. *Inorg. Chem.*, **1998**, **37**, 5198.
- [3] Magdalena E., Mikael L., Catharina H. et al *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, **114**, 4933.
- [4] Coats C. G., McGarvey J. J., Callaghan P. L. et al *J. Phys. Chem. B.*, **2001**, **105**, 730.
- [5] Barton J. K., Goldberg J. M., Kumar C. V. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, **108**, 2081.
- [6] Dandliker P. J., Nunez M. E., Barton J. K. *Biochemistry*, **1998**, **37**, 6491.
- [7] Stemp E. D. A., Barton J. K. *Inorg. Chem.*, **2000**, **39**, 3868.
- [8] DONG Yan-Hong (董艳红), TIAN Li-Qing (田笠卿), TANG Wen-Xia (唐雯霞), DAI An-Bang (戴安邦) et al *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, **1990**, **48**, 1171.
- [9] ZHAO Chang-Chun (赵长春), YU Jun-Sheng (于俊生), ZHANG Jie-Bing (章杰兵) *Wuji Huaxue Xuebao (Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1997**, **13**, 325.
- [10] Kumar C. V., Asuncion E. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, **115**, 8547.
- [11] CHEN Jing (陈景) *Guijinshu (Precious Metals)*, **1985**, **6**, 12.
- [12] HE Xing-Cun (何星存) *Guijinshu (Precious Metals)*, **1994**, **15**, 67.

## Spectroscopic Studies on the Interactions of Ag (I), Au (III), Pt (IV) with DNA

WANG Shu-Ling YU Jun-Sheng\* ZOU Yan-Hui

(*Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093*)

The interactions of Ag (I), Au (III), Pt (IV) ion with DNA were studied by fluorescence spectroscopy and absorption spectroscopy using berberine (BER) as the probe molecule. Obvious spectroscopic changes of the BER-DNA system in  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HAC-NaAC buffer solution were observed after adding Ag (I), Au (III), Pt (IV) ion to the binary system, respectively. The apparent binding constants of these three metal ions with DNA in the BER-DNA binary system were respectively obtained. According to the binding constants obtained, the order for the binding abilities of these three noble metal ions with DNA from the strongest to the weakest was as follows: Au (III) > Ag (I) > Pt (IV). Besides, the binding modes of three noble metal ions to DNA as well as the possible causes of different binding abilities of three noble metal ions with DNA were also discussed in this paper.

**Keywords:** Ag (I) Au (III) Pt (IV) DNA